

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/76570 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/00 PLESCHKA, Stephan [DE/DE]; Hinter der Ostanlage 5a, 35390 Giessen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01292

(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruk, Galileipl. 1, 81679 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. April 2001 (05.04.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, JP, US.

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 17 480.9 7. April 2000 (07.04.2000) DE

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): TRANSMIT GMBH [DE/DE]; Kerkrader Strasse 3, 35394 Giessen (DE).

Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LUDWIG, Stephan [DE/DE]; Langes Gräthlein 21, 97078 Würzburg (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



(54) Title: USE OF SUBSTANCES THAT ACT AS CASCADE INHIBITORS OF THE RAF/MEK/ERK SIGNAL CASCADE, FOR PRODUCING A MEDICAMENT TO TREAT DNA AND RNA VIRUSES

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON SUBSTANZEN, DIE ALS KASKADEN-INHIBITOR DER RAF/MEK/ERK-SIGNALKASKE WIRKEN, ZUR HERSTELLUNG EINES ARZNEIMITTELS GEGEN DNA- UND RNA-VIREN.

(57) Abstract: The invention relates to the use of substances that act as cascade inhibitors of the Raf/MEK/ERK signal cascade, in particular as MEK inhibitors, for producing a medicament for the preventive and anti-viral treatment of DNA and RNA viruses, in particular for the treatment of intranuclear replicating negative-strand RNA viruses, for example influenza or Borna disease viruses.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung besteht darin, Substanzen, die als Kaskaden-Inhibitoren der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, insbesondere MEK Inhibitoren wirken, zur Herstellung eines Arzneimittels zur präventiven und antiviralen Therapie gegen DNA- und RNA-Viren einzusetzen, im speziellen gegen intranuklear replizierende Negativstrang-RNA Viren, beispielsweise Influenza Viren oder Borna Disease Viren.

WO 01/76570 A2

Patentanmeldung

Bezeichnung der Erfindung:

20 Verwendung von Substanzen, die als Kaskaden-Inhibitor der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade wirken, zur Herstellung eines Arzneimittels gegen DNA- und RNA-Viren.

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung basiert auf der erstmaligen Beobachtung, daß eine Infektion mit den intranukleär replizierenden Negativstrangviren insbesondere Influenza A Virus und 5 Borna Disease Virus (BDV) zur Aktivierung der Raf/MEK/ERK Kaskade führt und daß überraschenderweise die Inhibition dieser Kaskade insbesondere durch einen MEK Inhibitor die Replikation dieser Virengruppe stark hemmt, ohne toxisch auf die Zellen zu wirken.

10 Eine verbesserte Therapie gegen DNA und RNA Viren, deren Vermehrung abhängig von der Aktivität der Raf/MEK/ERK Kaskade ist, richtet sich deshalb bevorzugt auf diesen Signalweg. Es wurde gefunden, daß dieser Signalweg durch Verwendung eines nicht-toxischen pharmakologischen Inhibitors blockiert wird.

15 Dieser nicht-toxische pharmakologische Inhibitor des Raf/MEK/ERK Signalweges ist erfindungsgemäß ein Kaskaden-Inhibitor, im besonderen ein MEK-Inhibitor.

Stand der Technik

Virusinfektionen stellen eine bedeutende Gesundheitsbedrohung 20 für Mensch und Tier dar. Besonders Infektionen mit dem Influenza A Virus gehören immer noch zu den großen Seuchen der Menschheit und fordern Jahr für Jahr nicht nur eine Vielzahl an Todesopfern, sondern sind auch gesamtwirtschaftlich, etwa durch krankheitsbedingte Arbeitsunfähigkeit ein immenser 25 Kostenfaktor [12].

Von ebenfalls wichtiger wirtschaftlicher Bedeutung sind Infektionen mit dem Borna Disease Virus (BDV), das vor allem Pferde und Schafe befällt, jedoch auch schon beim Menschen isoliert wurde und hier in Zusammenhang mit neurologischen 30 Erkrankungen gebracht wird [3,13].

Das Problem der Bekämpfung von RNA Viren ist die durch eine hohe Fehlerrate der viralen Polymerasen verursachte Wandlungsfähigkeit der Viren, die sowohl die Herstellung geeigneter Impfstoffe als auch das Entwickeln von antiviralen 35 Substanzen sehr schwierig macht.

Es hat sich gezeigt, daß die Anwendung von antiviralen Substanzen, die direkt gegen Funktionen des Virus gerichtet sind, mutationsbedingt sehr schnell zur Selektion resistenter Varianten führt. Ein Beispiel hierfür ist das anti-Influenza 5 Agenz Amantadin und dessen Derivate, welche gegen ein Transmembranprotein des Virus gerichtet sind und bereits binnen weniger Passagen zur Bildung resistenter Varianten führt. Auch die neuen anti-Influenza Therapeutika, die das Influenza-virale Oberflächenprotein Neuraminidase hemmen und unter 10 dem Handelsnamen RELANZA von Glaxo Wellcome in Deutschland vertrieben werden, haben bereits resistente Varianten in Patienten erzeugt [10]. Die Hoffnungen, die in dieses Therapeutikum gelegt wurden konnten auch aus diesem Grunde nicht erfüllt werden.

15 Aufgrund ihrer meist kleinen Genome und damit begrenzter Kodierungskapazität für replikationsnotwendige Funktionen, sind alle Viren in starkem Maße auf Funktionen ihrer Wirtszellen angewiesen. Durch Einflußnahme auf solche zelluläre Funktionen, die für die virale Replikation notwendig sind, 20 ist es möglich, die Virusreplikation in der infizierten Zelle negativ zu beeinträchtigen. Hierbei besteht für das Virus nicht die Möglichkeit, durch Anpassung die fehlende zelluläre Funktion zu ersetzen. Ein Entweichen vor dem Selektionsdruck durch Mutation ist hier nicht möglich. Dies konnte am Beispiel des Influenza A Virus mit relativ unspezifischen Hemmstoffen gegen zelluläre Kinasen und Methyltransferasen bereits gezeigt werden [18].

Nachteil speziell dieser Hemmstoffe ist, daß sie relativ unspezifisch und breit wirken und ihre zellulären Angriffs- 30 punkte nur schlecht definiert sind. Sie sind daher als Therapeutika ungeeignet. Hier liegt das Problem: Es gibt bis heute keine Hemmstoffe zellulärer Enzyme mit definiertem Angriffspunkt in der Zelle, die sowohl selektiv an dieser Stelle wirken, ohne toxisch für die Zelle zu sein, als auch die 35 virale Replikation im besonderen von RNA Viren, wie Borna Viren oder Influenza A Viren hemmen.

In Bezug auf die zellulären Prozesse, welche nach Virusinfektion induziert werden, findet man, daß eine Vielzahl von DNA und RNA Viren in der infizierten Wirtszelle einen definierten Signaltransduktionsweg, die sogenannte 5 Raf/MEK/ERK Kinase Kaskade aktivieren [2, 4, 14, 17].

Diese Kinase Kaskade gehört zu den wichtigsten Signalwegen in der Zelle und spielt eine bedeutende Rolle in Proliferations- und Differenzierungsprozessen.

Wachstumsfaktor induzierte Signale werden dabei durch 10 sukzessive Phosphorylierung von der Serin/Threonin Kinase Raf auf die Dual-spezifische Kinase MEK (MAP Kinase Kinase/ERK Kinase) und schließlich auf die Kinase ERK (extracellular signal regulated kinase) übertragen. Während man als Kinase-substrat von Raf nur MEK kennt und für MEK als einzige Sub-15 strate die ERK Isoformen identifiziert wurden, kann ERK eine ganze Reihe an Substraten phosphorylieren. Hierzu gehören beispielsweise die Phosphorylierung von Transkriptionsfakto-ren, was zu einer direkten Veränderung der zellulären Genex-pression führt [5, 15, 20].

20 Die Untersuchung der Rolle dieses Signalweges in zellulären Entscheidungsprozessen hat zur Identifizierung mehrerer pharmakologischer Inhibitoren geführt, welche den Signalweg unter anderem auf der Ebene von MEK, also am 'Flaschenhals' der Kaskade hemmen [1, 5, 7, 9].

25 Der MEK Inhibitor PD98059 (2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphtalen-4-on) [7] hemmt die Aktivierung von MEK durch die Kinase Raf.

Der MEK Inhibitor U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1, 4-30 bis[2-aminophenylthio]butadien) wurde als Substanz beschrie- ben, die partiell die Aktivierung AP-1 abhängiger Genexpres- sion [9] und die Proliferation von T Zellen hemmt [6].

Im Gegensatz zu PD98059 hemmt U0126 nicht nur die MEK Aktivierung sondern auch die Aktivität der Kinase selbst [8].

Schließlich wurde der MEK Inhibitor PD184352 beschrieben 35 (2-(2-chlor-4-jod-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluor-benzamid) [19], welcher bei oraler Gabe im Mausmodell

effizient das Wachstum von Kolonkarzinomen hemmen konnte, ohne erkennbare Zeichen von Toxizität bis zu einer kumulierten Dosis von 6g/kg Körpergewicht zu zeigen.

Aufgabe der Erfindung

5 Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, Substanzen zur Anwendung in der Vorbeugung oder Therapie gegen intranuklear replizierende Negativstrangviren vorzusehen, die nicht direkt gegen Funktionen des Virus gerichtet sind, sondern selektiv ein zelluläres Enzym hemmen und über diese selektive Wirkung
10 die virale Replikation von Viren.

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß diese Aufgabe durch einen erfindungsgemäßen Kaskaden-Inhibitor oder insbesondere einen MEK-Inhibitor enthaltendes Arzneimittel gemäß Anspruch 1 gelöst wird.

15 Ein erfindungsgemäßer Kaskaden-Inhibitor, insbesondere ein MEK-Inhibitor, ist eine Substanz, die dadurch charakterisiert ist, daß sie in einem "Kaskaden Assay für Inhibitoren des Raf/MEK/ERK Kinase Signalweges" die Signalkaskade in vitro hemmt und in einem "in vivo MEK und MAP Kinase Assay"
20 die Signalkaskade in vivo hemmt.

Kaskaden Assay für Inhibitoren des Raf/MEK/ERK Kinase Signalweges

Bei diesem Kaskaden Assay wird die Wirkung von Inhibitoren auf den Raf/MEK/ERK Kinase Signalweg durch Kinase-
25 vermittelten Einbau von radioaktivem 32P in das Myelin Basic Protein (MBP) in Anwesenheit eines 6xHistidin-Fusionsproteins von ERK (His-ERK) und eines Glutathione-S-transferase Fusionsproteins von MEK (GST-MEK) gemessen.

Das Reaktionsgemisch enthält die rekombinannten Proteine
30 in einem Puffer aus 20mM HEPES, pH7.4, 10mM MgCl₂, 1mM MnCl₂, 1mM EGTA, und 50mM 32P-gamma-ATP in einem Gesamtvolume von 100µl. Die Reaktion läuft 15 min bei 30°C und wird durch Zugabe von 20µl 5x Laemmli Puffer abgestoppt. Die radioaktiv markierten Proteine werden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und

mit Hilfe eines Phosphoimagers sichtbar gemacht. Kaskaden-Inhibitoren werden in einer Konzentration von 5-20 μ M auf ihre inhibierende Fähigkeit in diesem Assay getestet. Um zu unterscheiden, ob eine Verbindung in diesem Assay ein MEK oder ERK 5 Inhibitor ist, werden die Substanzen in einem zweiten experimentellen Ansatz mit MBP und His-ERK unter den obigen Reaktionsbedingungen in Abwesenheit von GST-MEK getestet. Eine Verbindung die im ersten Ansatz wirksam ist und im zweiten Ansatz keine Wirkung zeigt, ist ein MEK Inhibitor. Eine 10 Substanz die im zweiten Ansatz wirkt und im ersten Ansatz keine Wirkung zeigt ist ein ERK Inhibitor. Eine Substanz die in keinem der beiden Ansätze des ersten Assays wirkt, jedoch im folgenden in vivo MEK und MAP Kinase Assay eine Wirkung zeigt ist ein Raf-Inhibitor. Alle beschriebenen Inhibitoren 15 sind erfindungsgemäß Kaskaden-Inhibitoren.

In vivo MEK und MAP Kinase Assay

Zellen werden in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät und wachsen bis 80% Konfluenz in Zellkulturmedium mit 10% fötalem Kälberserum. Den Zellen wird für 8-12h das Serum entzogen. 20 Danach erfolgt Zugabe der Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere der MEK-Inhibitoren 30 min. vor mitogener Stimulation der Zellen, beispielsweise mit 100ng/ml TPA oder 100ng/ml PDGF. Nach 10 min Inkubation mit den mitogenen Stimuli werden die Zellen mit PBS gewaschen und in Triton-Lyse Puffer lysiert 25 (20mM Tris pH 7.4, 50mM Na- β -Glycerophosphat, 20mM Na-Pyrophosphat, 137mM NaCl, 10% (v/v) Glycerin, 1% (v/v) Triton X-100, 2mM EDTA, 1mM Pefabloc, 1mM Na-Vanadate, 5mM Benzamidin, 5 μ g/ml Aprotinin, 5 μ g/ml Leupeptin). Aus diesen Zellysaten wird endogene MEK mit einem MEK-spezifischen Antiserum 30 immunpräzipitiert und in einem Immunkomplex Kinaseassay in Anwesenheit von 32P-gamma-ATP, 0.1mM ATP und rekombinanter kinaseinaktiver His-ERK K>M als Substratprotein bei 30°C für 15 min in einem Puffer aus 10mM MgCl₂, 25mM β -Glycerolphosphat, 25mM HEPES pH 7.5, 5mM Benzamidin, 0.5mM 35 DTT und 1mM Na-Vanadat inkubiert. Parallel wird aus dem

gleichen Lysat endogene ERK mit einem spezifischen ERK-Antiserum immunpräzipitiert und mit gereinigtem MBP unter den gleichen Bedingungen wie MEK inkubiert. Die Proteine werden auf einem SDS-PAGE Gel aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphoimagers visualisiert. Ein Kaskaden-Inhibitor, insbesondere ein MEK-Inhibitor wirkt in diesem Assay sowohl hemmend auf die MEK Aktivierung, messbar an der Phosphorylierung von His-ERK K>M, als auch auf die ERK Aktivierung, messbar an der Phosphorylierung von MBP.

10 Die erfindungsgemäße Verwendung der Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere der MEK-Inhibitoren bezieht sich insbesondere auf folgende Substanzen:

15 a) 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-(1)benzopyran (wie auch beschrieben in WO 98/37881)

b) 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis[2-aminophenylthio]butadien (Kurzbezeichnung U0126)

20 c) 2-(2-chlor-4-jod-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluorbenzamid (Kurzbezeichnung PD18453)

d) 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-on (Kurzbezeichnung PD98059)

25 e) Substanzen gekennzeichnet dadurch, daß sie als erfindungsgemäße Kaskaden-Inhibitoren wirken und insbesondere aus den chemischen Stoffklassen der Butadien-Derivate oder Flavenderivate oder Benzamid-Derivate stammen

30 f) alle als Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere MEK-Inhibitoren wirkende Derivate der genannten Verbindungen

35 g) weitere als der Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere MEK-Inhibitoren wirkende Substanzen (Vorstufen, Salze oder "Prodrugs" im Sinne von [11, 16] der genannten Verbindungen oder

ihrer Derivate deren Wirksamkeit im Kaskaden Assay für Inhibitoren des Raf/MEK/ERK Kinase Signalweges oder im "in vivo MEK und MAP Kinase Assay" belegt ist.

Die Erfindung betrifft die Verwendung dieser Substanzen 5 als Arzneimittel an Patienten, die mit einem DNA- oder RNA-Virus, speziell einem intranuklear replizierenden Negativstrang-RNA Virus, beispielsweise einem Influenza A Virus oder einem Borna Disease Virus infiziert sind.

In einer anderen Form der erfindungsgemäßen Verwendung 10 wird vorgeschlagen, Arzneimittel mit diesen Substanzen in der Prävention einer Infektion mit einem DNA oder RNA-Virus, speziell einem intranuklear replizierenden Negativstrang-RNA Virus, beispielsweise einem Influenza A Virus oder einem Borna Disease Virus einzusetzen.

15 Der Begriff Patient bezieht sich dabei gleichermaßen auf Menschen und Wirbeltiere. Damit können die Arzneimittel in der Human- und Veterinärmedizin verwendet werden. Die therapeutisch wirksamen Substanzen der vorliegenden Erfindung werden den Patienten, als Teil einer pharmazeutisch akzeptablen Komposition entweder oral, rektal, parenteral intravenös, intramuskulär oder subkutan, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, intravasculär, lokal (Puder, Salbe oder Tropfen) oder in Sprayform verabreicht.

Pharmazeutisch akzeptable Kompositionen können die Modifikationen als Salze, Ester, Amide und "Prodrugs" beinhalten, 25 sofern sie nach zuverlässiger medizinischer Beurteilung keine übermäßige Toxizität, Irritationen oder allergische Reaktionen am Patienten auslösen.

Der Terminus "Prodrug" bezieht sich auf Verbindungen, 30 die zur Verbesserung der Aufnahme transformiert werden, wie beispielsweise durch Hydrolyse im Blut. Eine eingehende Diskussion ist bei [11] und [16] gegeben.

Dosierungsformen für die örtliche Administration der Verbindung dieser Erfindung schließen Salben, Puder, Sprays 35 oder Inhalationsmittel ein. Die aktive Komponente wird unter sterilen Bedingungen, mit einem physiologisch akzeptablen

Trägerstoff und möglichen Preservativen, Puffern oder Treibmitteln, je nach Bedarf, vermischt.

Beispiele

Das Ausführungsbeispiel 1 zeigt exemplarisch am Beispiel 5 des MEK-Inhibitors U0126, daß mit steigender Konzentration des MEK-Inhibitors U0126 im Zellkulturmedium die Anzahl der neu gebildeten, infektiösen Influenza A Viruspartikel signifikant reduziert ist:

Für die Vermehrung von Influenza A Viren werden per-
10 missive, eukaryontische Zellkulturen (Madine darby canine kidney (MDCK)-Zellen), in parallelen Ansätzen mit gleicher Zellzahl, nach allgemein üblichen Methoden für die Zellkul-
tur, mit einer physiologischen Salzlösung gewaschen und mit einer gleichen Menge des infektiösen Influenza A Virusstammes
15 WSN-HK (Reassortante mit sieben Gensegmenten von Influenza Stamm A/WSN/33 und dem NA-Gen von Influenza Stamm A/HK/8/68), in einem Verhältnis von 0,0025 infektiöse Viruspartikel pro Zelle für eine Stunde bei Raumtemperatur, infiziert.

30 min vor der Infektion werden die MDCK-Zellen in ge-
20 eignetem Zellkulturmedium, welches in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem MEK-Inhibitor U0126 versetzt ist (0µM, 30µM, 40µM, 50µM gelöst in DMSO) bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration, inkubiert. Als Lösungsmittelkontrolle werden MDCK-Zellen mit Zellkulturmedium inkubiert, welches mit
25 entsprechenden unterschiedlichen Mengen an DMSO versetzt ist. Während der Infektion wird dem Inokulum der MEK-Inhibitor U0126 bzw. als Lösungsmittel DMSO in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben.

Anschließend wird das Inokulum entfernt und die infi-
30 zierte Zellen in geeignetem Zellkulturmedium, welches in unterschiedlichen Konzentrationen mit dem MEK-Inhibitor U0126 versetzt sind (0µM, 30µM, 40µM, 50µM gelöst in DMSO), für 48h, bei 37°C und 5% CO₂-Konzentration, inkubiert. Als Lö-
35 sungsmittelkontrolle werden infizierte MDCK-Zellen mit Zell-
kulturmedium inkubiert, welches mit entsprechenden unter-

schiedlichen Mengen an DMSO versetzt sind. 24 Stunden nach der Infektion werden 200 μ l des Mediumüberstandes entnommen und das gleiche Volumen an Inhibitor- bzw. DMSO-haltigem Zellkulturmedium dem Mediumüberstand wieder zugegeben. Nach 5 48 Stunden wird erneut eine Probe entnommen. Die Zellkulturüberstände der jeweiligen Proben für den 24 und den 48 Stunden Wert werden nach üblichen virologischen Methoden auf die Menge an haemagglutinierenden Einheiten (HA-Titer), welche die Gesamtproduktion an Viruspartikeln darstellt, und auf die 10 Menge an neu gebildeten infektiösen Viruspartikeln (Plaque-Assay auf MDCK-Zellen) hin untersucht.

Im Ergebnis kann in einem solchen experimentellen Ansatz festgestellt werden, daß es bei zunehmender Konzentration des MEK-Inhibitors U0126 im Zellkulturmedium zu einer signifikanten 15 Reduktion (ca. 80% bei 50 μ M U0126) der Anzahl von neu gebildeten, infektiösen Viruspartikeln, im Vergleich zum Kontrollansatz ohne MEK-Inhibitor U0126 bzw. den Lösungsmittelkontrollen kommt. Die makroskopische Untersuchung von MDCK-Zellen, welche mit entsprechenden Konzentrationen an DMSO, 20 bzw. in DMSO gelöstem MEK-Inhibitor U0126 behandelt wurden, als auch eine Zytotoxizitätsuntersuchung mittels Propidiumjodidfärbung, zeigt, daß weder Lösungsmittel noch Inhibitor einen signifikanten zytotoxischen Effekt auf die Zellen haben.

25 Das Ausführungsbeispiel 2 zeigt, daß mit steigender Konzentration des MEK-Inhibitors U0126 im Zellkulturmedium auch die Anzahl der neu gebildeten, infektiösen Borna Disease Viruspartikel signifikant reduziert wird:
Inhibitor-vorbehandelte Zellen werden mit BDV infiziert und 30 die Ausbreitung der Infektion in einer indirekten Immunfluoreszenz gegen das virale Nucleoprotein beobachtet. Bei einer einmaligen Gabe von 25 μ M MEK Inhibitor (U0126) sind nach einer Kultivierungszeit von 7 Tagen keine Virus-Foci sichtbar, sondern nur einzelne infizierte Zellen. Bei einer Gabe 35 von 12,5 μ M Kinase Inhibitor (U0126) ist der Effekt nicht mehr deutlich und bei einer Gabe von 6 μ M Kinase Inhibitor

(U0126) ist kein Unterschied der Virus-Foci im Vergleich zu unbehandelten, infizierten Kontrollzellen zu sehen. Der Inhibitor wirkt somit dosisabhängig auf der Ebene der Virusreplikation.

5 Die inhibitorische Wirkung des MEK Inhibitors U0126 in den aufgezeigten Anwendungen zeigt, daß Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere MEK Inhibitoren als antivirale Agentien gegen Influenza- und Borna Viren im speziellen aber auch gegen andere RNA und DNA Viren, bei denen eine Abhängigkeit der
10 viralen Vermehrung von der Aktivität der Raf/MEK/ERK Kaskade besteht, angewendet werden können. Der Signalweg ist dabei erfindungsgemäß Ziel der antiviralen Therapie und wird bevorzugt durch Anwendung eines nicht-toxischen pharmakologischen Kaskaden-Inhibitors, insbesondere eines MEK Inhibitors,
15 gehemmt.

Bezugszeichenliste Literatur

[1] Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D. T., and Saltiel, A. R. (1995). PD 098059 is a specific inhibitor of 5 the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo J. Biol. Chem. 270, 27489-27494.

[2] Benn, J., Su, F., Doria, M., and Schneider, R. J. (1996). Hepatitis B virus HBx protein induces transcription factor 10 AP-1 by activation of extracellular signal-regulated and c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinases. J. Virol. 70, 4978-4985.

[3] Bode, L., Zimmermann, W., Ferszt, R., Steinbach, F., and 15 Ludwig, H. (1995). Borna disease virus genome transcribed and expressed in psychiatric patients [see comments]. Nat Med 1, 232-6.

[4] Bruder, J. T., and Kovesdi, I. (1997). Adenovirus infection stimulates the Raf/MAPK signaling pathway and induces 20 interleukin-8 expression. J. Virol. 71, 398-404.

[5] Cohen, P. (1997). The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. Trends in Cell 25 Biol. 7, 353-361.

[6] DeSilva, D. R., Jones, E. A., Favata, M. F., Jaffee, B. D., Magolda, R. L., Trzaskos, J. M., and Scherle, P. A. (1998). Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase 30 blocks T cell proliferation but does not induce or prevent anergy. J. Immunol. 160, 4175-4181.

[7] Dudley, D. T., Pang, L., Decker, S. J., Bridges, A. J., and Saltiel, A. R. (1995). A synthetic inhibitor of the 35 mitogen-activated protein kinase cascade. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 92, 7686-7689.

[8] Duncia, J. V., Santella, J. B. r., Higley, C. A., Pitts, W. J., Wityak, J., Frietze, W. E., Rankin, F. W., Sun, J. H., Earl, R. A., Tabaka, A. C., Teleha, C. A., Blom, K. F.,
5 Favata, M. F., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Horiuchi, K., Copeland, R. A., Scherle, P. A., Trzaskos, J. M., Magolda, R. L., Trainor, G. L., Wexler, R. R., Hobbs, F. W., and Olson, R. E. (1998). MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 8, 2839-44.

10

[9] Favata, M. F., Horiuchi, K. Y., Manos, E. J., Daulerio, A. J., Stradley, D. A., Feeser, W. S., Van Dyk, D. E., Pitts, W. J., Earl, R. A., Hobbs, F., Copeland, R. A., Magolda, R.
15 L., Scherle, P. A., and Trzaskos, J. M. (1998). Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 273, 18623-18632.

[10] Gubareva, L. V., Matrosovich, M. N., Brenner, M. K.,
20 Bethell, R. C., and Webster, R. G. (1998). Evidence for zanamivir resistance in an immunocompromised child infected with influenza B virus. *J Infect Dis* 178, 1257-62.

[11] Higuchi, T., and Stella, V. (1987). Prodrugs as novel
25 delivery systems. In A.C.S. Symposium Series.

[12] Lamb, R. A., and Krug, R. M. (1996). Orthomyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, B. N. e. a. Fields, ed. (Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers), pp. 1353-1395.

30

[13] Planz, O., Rentzsch, C., Batra, A., Winkler, T., Buttner, M., Rziha, H. J., and Stitz, L. (1999). Pathogenesis of borna disease virus: granulocyte fractions of psychiatric patients harbor infectious virus in the absence of antiviral antibodies. *J Virol* 73, 6251-6.

35

[14] Popik, W., and Pitha, P. M. (1998). Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, 5 and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. *Virology* 252, 210-217.

[15] Robinson, M. J., and Cobb, M. H. (1997). Mitogen-10 activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.

[16] Roche, E. B. E. (1987). Bioreversible Carriers in Drug Design, E. B. Roche, ed.: American Pharmaceutical Association 15 and Pergamon Press.

[17] Rodems, S. M., and Spector, D. H. (1998). Extracellular signal-regulated kinase activity is sustained early during human cytomegalovirus infection. *J. Virol.* 72, 9173-9180.
20

[18] Scholtissek, C., and Muller, K. (1991). Failure to obtain drug-resistant variants of influenza virus after treatment with inhibiting doses of 3-deazaadenosine and H7. *Arch Virol.* 119, 111-118.
25

[19] Sebolt-Leopold, J. S., Dudley, D. T., Herrera, R., Van Becelaere, K., Wiland, A., Gowan, R. C., Tecle, H., Barrett, S. D., Bridges, A., Przybranowski, S., Leopold, W. R., and Saltiel, A. R. (1999). Blockade of the MAP kinase pathway 30 suppresses growth of colon tumors in vivo. *Nature Med.* 5, 810-816.

[20] Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 205-215.
35

Patentansprüche

1. Substanzen gekennzeichnet dadurch, daß sie als erfindungsgemäße Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere MEK-Inhibitoren wirken, insbesondere aus den chemischen Stoffklassen der Butadien-Derivate oder Flaven-Derivate oder Benzamid-Derivate stammend
2. Verwendung von erfindungsgemäßen Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere aus den chemischen Stoffklassen der Butadien-Derivate oder Flaven-Derivate oder Benzamid-Derivate stammend, insbesondere MEK Inhibitoren, im speziellen
 - a) 2-(2-Amino-3-methoxyphenyl)-4-oxo-4H-(1)benzopyran, 1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,
 - b) 4-bis[2-aminophenylthio]butadien,
 - c) 2-(2-chlor-4-jod-phenylamino)-N-cyclopropylmethoxy-3,4-difluorbenzamid,
 - d) 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphthalen-4-on
 - e) alle als Kaskaden-Inhibitoren, insbesondere MEK Inhibitoren wirkende Vorstufen, Salze, Prodrugs, Derivate oder Mischungen der genannten Verbindungen, zur Herstellung eines Arzneimittels zur Vorbeugung und Behandlung von Infektionen durch DNA oder RNA-Viren bei Mensch und Tier.
3. Verwendung nach Anspruch 2 zur Behandlung von Infektionen durch Negativstrang RNA-Viren.
4. Verwendung nach Anspruch 2 zur Behandlung von Infektionen durch intranukleär replizierende Negativstrang-RNA Viren.
5. Verwendung nach Anspruch 2 zur Behandlung von Infektionen durch Influenza und Borna Viren.

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. Oktober 2001 (18.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/76570 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 31/352,
31/145, 31/166, A61P 31/12, 31/16

PLESCHKA, Stephan [DE/DE]; Hinter der Ostanlage
5a, 35390 Giessen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/01292 (74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Al-
tenburg, Geissler, Isenbruk, Galileipl. 1, 81679 München
(DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:
5. April 2001 (05.04.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, CN, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:
100 17 480.9 7. April 2000 (07.04.2000) DE

Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht

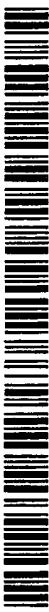
(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): TRANSMIT GESELLSCHAFT FÜR TECH-
NOLOGIETRANSFER MBH [DE/DE]; Kerkrader
Strasse 3, 35394 Giessen (DE).

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 10. Mai 2002

(72) Erfinder; und

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): LUDWIG, Stephan
[DE/DE]; Langes Gräßlein 21, 97078 Würzburg (DE).



(54) Title: USE OF SUBSTANCES THAT ACT AS CASCADE INHIBITORS OF THE RAF/MEK/ERK SIGNAL CASCADE,
FOR PRODUCING A MEDICAMENT TO TREAT DNA AND RNA VIRUSES

WO 01/76570 A3

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON SUBSTANZEN, DIE ALS KASKADEN-INHIBITOR DER RAF/MEK/ERK-SIG-
NALKASKADE WIRKEN, ZUR HERSTELLUNG EINES ARZNEIMITTELS GEGEN DNA- UND RNA-VIREN.

(57) Abstract: The invention relates to the use of substances that act as cascade inhibitors of the Raf/MEK/ERK signal cascade, in particular as MEK inhibitors, for producing a medicament for the preventive and anti-viral treatment of DNA and RNA viruses, in particular for the treatment of intranuclear replicating negative-strand RNA viruses, for example influenza or Borna disease viruses.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung besteht darin, Substanzen, die als Kaskaden-Inhibitoren der Raf/MEK/ERK-Signalkaskade, insbesondere MEK Inhibitoren wirken, zur Herstellung eines Arzneimittels zur präventiven und antiviralen Therapie gegen DNA- und RNA-Viren einzusetzen, im speziellen gegen intranuklear replizierende Negativstrang-RNA Viren, beispielsweise Influenza Viren oder Borna Disease Viren.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K31/352 A61K31/145 A61K31/166 A61P31/12 A61P31/16

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X, P	WO 00 40237 A (BRIDGES ALEXANDER JAMES ; DUDLEY DAVID THOMAS (US); GRACHECK STEPHEN) 13 July 2000 (2000-07-13) page 76, line 1 - line 10 page 78, line 27 -page 79; table 2 ---	1-5
X, P	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2001-338036 XP002185544 & JP 2001 055376 A (WARNER LAMBERT CO), 27 February 2001 (2001-02-27) abstract ---	1-4
X	WO 99 01426 A (DOHERTY ANNETTE MARIAN ; BARRETT STEPHEN DOUGLAS (US); BRIDGES ALEX) 14 January 1999 (1999-01-14) page 9, line 8 ---	1,2 -/-

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 December 2001

Date of mailing of the international search report

04/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 01/01292

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 01421 A (DOHERTY ANNETTE MARIAN ; BARRETT STEPHEN DOUGLAS (US); BRIDGES ALEX) 14 January 1999 (1999-01-14) page 7, line 7 ---	1,2
X, P	SMITH ET AL: "RAS-BINDING AND PHOSPHORYLATION BY HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 RR1 PK (ICP10)" JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 74, no. 22, November 2000 (2000-11), pages 10417-10429, XP002185543 abstract ---	1,2
X	WO 98 37881 A (BRIDGES ALEXANDER JAMES ; WARNER LAMBERT CO (US)) 3 September 1998 (1998-09-03) cited in the application claims 1-7 -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 01/01292

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0040237	A	13-07-2000	AU EP WO	2203800 A 1140067 A1 0040237 A1	24-07-2000 10-10-2001 13-07-2000
JP 2001055376	A	27-02-2001	NONE		
WO 9901426	A	14-01-1999	AU BR CN EP HR HU NO PL TW WO ZA	8262798 A 9810366 A 1261877 T 0993439 A1 980368 A1 0003731 A2 996491 A 337698 A1 396149 B 9901426 A1 9805728 A	25-01-1999 29-08-2000 02-08-2000 19-04-2000 30-04-1999 28-04-2001 29-12-1999 28-08-2000 01-07-2000 14-01-1999 27-01-1999
WO 9901421	A	14-01-1999	AU BR EP HR WO ZA	8262698 A 9810385 A 0993437 A1 980369 A1 9901421 A1 9805726 A	25-01-1999 05-09-2000 19-04-2000 30-04-1999 14-01-1999 27-01-1999
WO 9837881	A	03-09-1998	AU WO US ZA	5610398 A 9837881 A1 6251943 B1 9801578 A	18-09-1998 03-09-1998 26-06-2001 02-09-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01292

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K31/352 A61K31/145 A61K31/166 A61P31/12 A61P31/16

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X, P	WO 00 40237 A (BRIDGES ALEXANDER JAMES ; DUDLEY DAVID THOMAS (US); GRACHECK STEPHEN) 13. Juli 2000 (2000-07-13) Seite 76, Zeile 1 - Zeile 10 Seite 78, Zeile 27 -Seite 79; Tabelle 2 ---	1-5
X, P	DATABASE WPI Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 2001-338036 XP002185544 & JP 2001 055376 A (WARNER LAMBERT CO), 27. Februar 2001 (2001-02-27) Zusammenfassung ---	1-4
X	WO 99 01426 A (DOHERTY ANNIE MARIAN ; BARRETT STEPHEN DOUGLAS (US); BRIDGES ALEX) 14. Januar 1999 (1999-01-14) Seite 9, Zeile 8 ---	1,2
	-/-	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *'A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *'E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *'L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *'O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- *'P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- *'T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *'X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *'Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *'*& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
13. Dezember 2001	04/02/2002
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Trifilieff-Riolo, S

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 01/01292

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 99 01421 A (DOHERTY ANNETTE MARIAN ; BARRETT STEPHEN DOUGLAS (US); BRIDGES ALEX) 14. Januar 1999 (1999-01-14) Seite 7, Zeile 7 ---	1,2
X, P	SMITH ET AL: "RAS-BINDING AND PHOSPHORYLATION BY HERPES SIMPLEX VIRUS TYPE 2 RR1 PK (ICP10)" JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 74, Nr. 22, November 2000 (2000-11), Seiten 10417-10429, XP002185543 Zusammenfassung ---	1,2
X	WO 98 37881 A (BRIDGES ALEXANDER JAMES ; WARNER LAMBERT CO (US)) 3. September 1998 (1998-09-03) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 1-7 -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PC1/DE 01/01292

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0040237	A	13-07-2000	AU EP WO	2203800 A 1140067 A1 0040237 A1		24-07-2000 10-10-2001 13-07-2000
JP 2001055376	A	27-02-2001		KEINE		
WO 9901426	A	14-01-1999	AU BR CN EP HR HU NO PL TW WO ZA	8262798 A 9810366 A 1261877 T 0993439 A1 980368 A1 0003731 A2 996491 A 337698 A1 396149 B 9901426 A1 9805728 A		25-01-1999 29-08-2000 02-08-2000 19-04-2000 30-04-1999 28-04-2001 29-12-1999 28-08-2000 01-07-2000 14-01-1999 27-01-1999
WO 9901421	A	14-01-1999	AU BR EP HR WO ZA	8262698 A 9810385 A 0993437 A1 980369 A1 9901421 A1 9805726 A		25-01-1999 05-09-2000 19-04-2000 30-04-1999 14-01-1999 27-01-1999
WO 9837881	A	03-09-1998	AU WO US ZA	5610398 A 9837881 A1 6251943 B1 9801578 A		18-09-1998 03-09-1998 26-06-2001 02-09-1998